

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected <input type="text" value="Free"/>

1. ☐ 1/5/1

009975356    \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1994-243069/199430

XRAM Acc No: C94-110929

XRPX Acc No: N94-191699

Carrier prodn for immunoassay - by bonding protein  
(substance) not involved in reaction to carrier, then bonding protein of  
hapten which is involved in immunological reaction, with other protein  
(substance)

Patent Assignee: TOSOH CORP (TOYJ )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6174726	A	19940624	JP 92323043	A	19921202	199430 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92323043 A 19921202

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6174726	A		4	G01N-033/544	

Abstract (Basic): JP 6174726 A

A protein or substance obtd. by decomposing the protein, which is practically not involved in the immunological reaction (pref. bovine blood serum albumin), is bonded to a carrier having any size and shape. Then a protein or hapten which is involved in the immunological reaction is bonded with the protein or the protein decomposition substance (pref. via glutaraldehyde).

USE/ADVANTAGE - Since the protein or hapten which is involved in the immunological reaction is not directly bonded with the carrier, but bonded via a protein or decomposition substance, so-called nonspecific reactions can be avoided. The structure on the carrier surface which is inconvenient to the immunological reaction can be modified, so the adsorption of antigen/antibody in immunologically inactive conditions can also be avoided.

In an example, EVA copolymer pellets having average length 1.5 mm, and average dia. 1.4 mm, were granulated into true spheres, ferrite was melted, and they were further coated with glycidyl methacrylate (GMA) and treated with caustic soda/methanol soln. so that the epoxy gp. on the surface layer was opened to make a diol. 1000 of these carriers were mixed with 2.5 ml dry acetone contg. 50 mg N,N'-carbonyldiimidazole, under nitrogen atmos. at a room temp. for 30 mins. Phosphate buffer soln. (pH 7.4) contg. 1 wt.% BSA was added and incubated at a room temp. for 16 hours. The carrier was washed with phosphate buffer (pH 7.4) and non-bonded BSA was removed, then phosphate buffer soln. (pH 7.4) contg. 1% glutaraldehyde was added and incubated at a room temp. for 4 hours. Phosphate buffer soln. contg. 10 micro g human beta 2 microglobin was added. Then phosphate buffer soln. (pH 7.4) contg. 1 wt.% BSA was added and incubated at a room temp. for 16 hours to provide the carrier.

Dwg. 0/0

Title Terms: CARRY; PRODUCE; IMMUNOASSAY; BOND; PROTEIN; SUBSTANCE; REACT;

CARRY; BOND; PROTEIN; HAPTEN; IMMUNOLOGICAL; REACT; PROTEIN; SUBSTANCE

Derwent Class: A96; B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/544

International Patent Class (Additional): G01N-033/543

File Segment: CPI; EPI

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-174726

(43)公開日 平成6年(1994)6月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 33/544	Z	9015-2 J		
33/543	Q	9217-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-323043

(22)出願日 平成4年(1992)12月2日

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 萩 規男

神奈川県大和市上和田180番地の1

(54)【発明の名称】 免疫測定用担体を製造する方法及び免疫測定用担体

(57)【要約】

【目的】 抗原又は抗体等の担体への非特異的吸着が生じたり、抗原又は抗体等が免疫学的に不活性な状態で吸着されてしまうことのない免疫測定用担体及びそれを製造する方法を提供する。

【構成】 任意の大きさ、形状に整形された担体に免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を結合させ、更に当該蛋白質あるいは当該蛋白質分解物に免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンを結合させることを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法、及び、任意の大きさ、形状に整形された担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を介して免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンが結合されていること特徴とする免疫測定用担体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 任意の大きさ、形状に整形された担体に免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を結合させ、更に当該蛋白質あるいは当該蛋白質分解物に免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンを結合させることを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項2】 免疫反応には実質的に関与しない蛋白質としてウシ血清アルブミンを使用する請求項1の免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項3】 免疫反応に接関与する蛋白質又はハプテンをグルタルアルデヒドを介して免疫反応には実質的に関与しない蛋白質あるいはその分解物に結合させる請求項1又は2の免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項4】 任意の大きさ、形状に整形された担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を介して免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンが結合されていることを特徴とする免疫測定用担体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、免疫測定用担体を製造する方法及び免疫測定用担体に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 血清、尿等の生体資料中に含有される微量の物質、例えば蛋白質等の含有量は、抗体や抗原を利用した免疫測定を実施することで知ることができる。

【0003】 免疫測定を実施するための測定用キット等においては、抗体や抗原を固定化するために不溶性の担体を用いることがあり、従来、例えばプラスチック等の熱可塑性樹脂性の担体が多用されている。

【0004】 これら熱可塑性樹脂の担体は、例えば原料を任意の大きさや形状に整形した後、これを放射線や化学薬品を用いて免疫反応に関与する蛋白質等が結合し得るように処理したものである。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従来の免疫測定用担体では、熱可塑性樹脂等の担体に直接又は化学試薬を介して抗原又は抗体等を結合させている。従って抗原又は抗体等の担体への非特異的吸着が生じたり、抗原又は抗体等が免疫学的に不活性な状態で吸着されてしまう等の課題がある。

【0006】 化学試薬を用いて抗原又は抗体を結合させる場合には、抗原又は抗体中の活性基と担体の特異的に結合させ易いことから、前記の場合と比較してこれら抗原又は抗体等が免疫学的に不活性な状態で結合されることは少ないが、一方では、担体表面に活性基を導入するための操作が要求されるという課題がある。

【0007】 以上の課題に加え、担体それ自体の物理的性質によっては、免疫測定で使用される標識物質の担体への非特異的吸着が生じるという課題がある。この非特異的吸着が生じた場合には、本来陰性であるべき試料に

ついて陽性との結果が得られてしまう等の不都合を生じかねないため、従来は抗原又は抗体等を結合した後、ブロッキングと呼ばれる操作を実施しているが、完全とはいえなかった。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、従来技術の課題を解決し得る免疫測定用担体やその製造方法について鋭意検討した結果、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、任意の大きさ、形状に整形された担体に免疫反応には実質的に接関与しない蛋白質又はその分解物を結合させ、更に当該蛋白質あるいは当該蛋白質分解物に免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンを結合させることを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法である。また本発明は、任意の大きさ、形状に整形された担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を介して免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンが結合されていること特徴とする免疫測定用担体、である。以下本発明を詳細に説明する。

## 【0009】 本発明の免疫測定用担体を製造する方法

は、担体に、抗原や抗体（断片化されたもの等を含む）、更にはハプテン等の免疫反応に関与する蛋白質等を直接又は化学試薬のみを介して結合させるのではなく、まず免疫反応には実質的に関与しない蛋白質あるいは当該蛋白質分解物を結合させ、これに更に前記蛋白質等を結合させることを特徴とする。

【0010】 本発明で使用する担体は、免疫反応には実質的に関与しない蛋白質あるいは当該蛋白質分解物を結合できればどのようなものでも良く、例えばポリスチレン、塩化ビニル樹脂、エチレン酢酸ビニル共重合体等の樹脂や、アルミナ、金属、金属酸化物等の無機物質が例示できる。また担体の大きさや形状には制限はなく、任意の大きさや形状を選択することができるが、特に形状については、体積対表面積の比等を考慮すると球状が最も好ましい。

【0011】 免疫反応には実質的に関与しない蛋白質等としては、例えば、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、カゼインやそれらの分解物（例えば加水分解物）等を使用することができる。これらは、化学的な処理又は物理的吸着により前記担体と結合すれば良いが、操作性を向上させるためには物理的吸着により担体に結合させることが好ましい。前記した中でもウシ血清アルブミンは、前述の担体に物理的に吸着させることができ、特に好ましい。

【0012】 免疫反応には実質的に関与しない蛋白質等を担体に結合させた後、当該蛋白質等に更に免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンを結合させる。この結合は化学薬品によることが好ましく、例えばグルタルアルデヒド等の二以上の化学的に活性な基を有する試薬を使用し、担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質等を修飾した後に免疫反応に関与する蛋白質又はハ

## 3

ブテンを結合させることが例示できる。

【0013】以上のようにして製造される本発明の免疫測定用担体は、任意の大きさ、形状に整形された担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質又はその分解物を介して免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンが結合されている。そして本発明の免疫測定用担体は、例えば競合法やサンドイッチ法等の免疫測定に好適に使用することができる。

## 【0014】

【実施例】以下本発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

## 【0015】実施例1

ウォーターストランド法により得た平均直径1.4mm、平均長さ1.5mmのエチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)ペレット(東ソー(株)製)を、特願昭61-38279号に記載された方法に従って真球化し、フェライト(東ソー(株)製)を熱融着させ、更にグリシジルメタクリレート(GMA)でコートし、更に苛性ソーダ/メタノール溶液により表面層のエポキシ基を開環させてジオールにしたものを担体として以下の操作に使用した。

【0016】担体1000個を、特願昭61-3829号に記載された方法に従って50mgのN,N'-カルボニルジイミダゾール(CDI、東京化成工業(株)製)を含む乾燥アセトン2.5mlと窒素雰囲気、室温下で30分間攪拌した後、1重量%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて室温下で16時間インキュベートした。

【0017】このようにしてBSAを結合させた担体をリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄して未結合BSAを除去した後、1%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加え、室温下で4時間インキュー

## 4

トした後洗浄した。次いで10μgのヒトβ2ミクログロブリンを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて室温下で16時間インキュベートし、最後に1重量%BSAを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて室温下で16時間インキュベートするブロッキング操作を行い、本発明の担体を製造した。

【0018】比較のため、BSAを結合させる操作を行わず、CDI処理に続いて10μgのヒトβ2ミクログロブリンを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加え、室温下で16時間インキュベートし、最後に1重量%BSAを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて室温下で16時間インキュベートするブロッキング操作を行ったのみの比較担体を製造した。

【0019】以上のようにして製造した本発明の担体と比較担体を用いて、β2ミクログロブリンの免疫測定を行った。まず担体又は比較担体の12個を容器に入れ、各々0、10、100、1000、10000ng/mlのβ2ミクログロブリンを含む溶液の50μlと、アルカリフォスファターゼで標識したウサギ抗β2ミクログロブリン抗体(抗体は森永生科学研究所製)を100μl加え、37℃で40分間免疫反応を行わせた後、リン酸緩衝液(pH7.4)で容器及び担体を洗浄して遊離物を除去した。

【0020】続いてアルカリフォスファターゼの基質として1mMの4-メチルウンベリフェロン溶液(pH10)を、37℃条件下で100μl加え、10分間反応させた後、2.9mlの酵素反応停止液を加えて酵素反応を停止させ、励起波長360nm、蛍光波長450nmで蛍光測定を行った。結果を表1に示す。表1は、酵素反応により生成した4-メチルウンベリフェロン(4MU)の濃度を示している。

## 【0021】

## 【表1】

BMG (ng/ml)	本 発 明		比 較 例	
	(nM)	B/B0(%)	(nM)	B/B0(%)
0	4020	100	2550	100
10	3500	87.1	2040	79.9
100	2220	55.2	1260	49.5
300	1640	40.8	893	35.0
1000	859	21.4	494	19.4
10000	363	9.0	231	9.0

【0022】表1によれば、本発明の担体を使用した場 50 合には、比較担体(従来の担体)を使用した場合に比べ

5

6

、て高い反応性を有していることが分かる。なお、表中のB/B0は、0 ng/mlの $\beta$ 2ミクログロブリン溶液を測定した場合の値(nM)を100(%)とした時の各測定値の割合を、本発明とは本発明の担体を用いた場合の結果を、比較例とは比較担体を用いた場合の結果をそれぞれ示す。

## 【0023】

【発明の効果】本発明は、免疫反応に関与する蛋白質又はハプテンを直接担体に結合させるのではなく、担体に結合した免疫反応には実質的に関与しない蛋白質あるいはその分解物を介して結合させるものである。従って、免疫反応における目的生成物である免疫複合体に関係なく標識物が直接担体に結合してしまういわゆる非特異的結合に対し、担体を覆う免疫反応には実質的に関与しない蛋白質あるいはその分解物のコーディングにより担体表面の性質を改善するという効果により、このような非特異的反応を減少できる。

【0024】また本発明は、担体表面の免疫反応に不都合な構造を修正し得るという効果を有する。即ち、従来の担体は表面積を増加させるためにその表面を粗面化したものが多いが、このような担体に抗原や抗体等を直接

結合させた場合、担体内部にこれらが侵入してしまうのである。内部に侵入した抗原や抗体等を実際の免疫反応に関与させるには、免疫反応を長時間に渡って行わなければならないし、またそれらが免疫反応に関与する程度に免疫反応を行った場合には、当該担体内部に侵入したものの未結合状態で存在する標識物等を通常の洗浄工程では除去し得ないことになる。ところが本発明の担体では、表面を免疫反応に実質的に関与しない蛋白質等で覆っているから、抗原や抗体等は担体内部に侵入し難く、かつそれらを結合させるのに十分な表面積を提供できるのである。

【0025】本発明では、免疫反応に関与する蛋白質等は免疫反応に実質的に関与しない蛋白質等を介して結合されるから、その結合量は両者の結合に使用する化学試薬や当該試薬を用いる化学反応の諸条件により比較的簡便に、かつ高精度に管理することができる。このことは、特に競合法等の、担体に結合させる抗原や抗体等の量を厳密に管理する必要のある免疫測定において有効であることを意味する。

## 20 【0026】